

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-037705  
(43)Date of publication of application : 06.02.2002

---

(51)Int.CI. A01N 37/46  
A01N 43/72  
A01N 65/00  
A23L 2/44  
A23L 3/3526

---

(21)Application number : 2000-224738 (71)Applicant : NATIONAL AGRICULTURAL  
RESEARCH ORGANIZATION  
(22)Date of filing : 26.07.2000 (72)Inventor : OIDA SHIGERU

---

**(54) ANTIBACTERIAL AGENT FOR ACID-RESISTANT AND HEAT-RESISTANT BACTERIUM****(57)Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a highly safe antibacterial agent derived from naturally occurring matter, resistant to pasteurization and having the activity to inhibit the proliferation of acid-resistant and heat-resistant bacteria including *Alicyclobacillus acidoterrestris* causing fruits juice putrefaction.

**SOLUTION:** This antibacterial agent for acid-resistant and heat-resistant bacteria is characterized by comprising as the active ingredient  $\alpha$ -type and/or  $\beta$ -type thionine(s). A fruits juice preservative characterized by containing as the active ingredient the above thionine(s) is provided.

---

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 26.07.2000  
[Date of sending the examiner's decision of rejection] 06.01.2004  
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]  
[Date of final disposal for application]  
[Patent number]  
[Date of registration]  
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]  
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]  
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-37705

(P2002-37705A)

(43)公開日 平成14年2月6日(2002.2.6)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>8</sup> (参考)
A 01 N 37/46		A 01 N 37/46	4 B 01 7
43/72		43/72	4 B 02 1
65/00		65/00	A 4 H 01 1
A 23 L 2/44		A 23 L 3/3526	5 0 1
3/3526	5 0 1	2/00	P

審査請求 有 請求項の数 2 OL (全 4 頁)

(21)出願番号 特願2000-224738(P2000-224738)

(22)出願日 平成12年7月26日(2000.7.26)

(71)出願人 501203344  
独立行政法人 農業技術研究機構  
茨城県つくば市観音台3-1-1  
(72)発明者 老田 茂  
香川県善通寺市文京町2-2-15-402  
(74)代理人 100074077  
弁理士 久保田 藤郎 (外1名)  
Fターム(参考) 4B017 LC10 LE08 LG01 LG04 LK15  
LL07  
4B021 MC01 MK23 MP01  
4H011 AA02 BA01 BB19 BB22 BC08  
BC18 BC19 DA13 DD07 DH06  
DH11

(54)【発明の名称】 耐酸耐熱性細菌用抗菌剤

(57)【要約】

【課題】 低温殺菌法に耐性で、果汁の腐敗を引き起こすアリシクロバチルス・アシドテレストリスなどの耐酸耐熱性細菌の増殖を阻害する作用を有し、かつ天然物に由来し、安全性の高い抗菌剤を提供すること。

【解決手段】 アルファ型および/またはベータ型チオニンを有効成分として含有することを特徴とする耐酸耐熱性細菌用抗菌剤並びに該チオニンを有効成分として含有することを特徴とする果汁の保存料。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルファ型および／またはベータ型チオニンを有効成分として含有することを特徴とする耐酸耐熱性細菌用抗菌剤。

【請求項2】 アルファ型および／またはベータ型チオニンを有効成分として含有することを特徴とする果汁の保存料。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、耐酸耐熱性細菌用抗菌剤に関し、詳しくは天然物由来で安全なペプチドを有効成分として含有するアリシクロバチルス・アシドテリストリス (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) などの耐酸耐熱性細菌用抗菌剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 耐酸性と耐熱性を併せ持つ代表的な細菌として、アリシクロバチルス・アシドテリストリスやアリシクロバチルス・アシドカルダリウス等が知られている。これら細菌の胞子は、果汁の一般的な低温殺菌法に對して耐性がある。そのため、近年アリシクロバチルス・アシドテリストリスによる果汁の腐敗が世界中で問題となっている。果汁中における本菌の増殖を抑制するには、安息香酸などの合成保存料の添加が有効であるが、合成品でなく天然物に由来し、安全性の高い物質が求められている。天然物由来で本菌に對して有効な抗菌剤としては、これまでに乳酸菌由来ペプチドであるナイシンが報告されている (International Journal of Food Science and Technology, 34巻、81～85頁、1999年) のみである。しかし、ナイシンはデヒドロアラニンなどの特殊なアミノ酸を含んでおり、日本では食品添加物として未だ認められていない。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 したがって、果汁の保藏において、天然物に由来し、かつ低濃度で効果を発揮するアリシクロバチルス・アシドテリストリスなどの耐酸耐熱性細菌用の抗菌剤が求められている。本発明者は、麦類由来ペプチドのアルファ型およびベータ型チオニンの特性について調査・研究してきた。これまでに植物病原性糸状菌に対するチオニンの抗菌作用は知られていた (Plant Science, 92巻、169～177頁、1993年) が、耐酸耐熱性細菌であるアリシクロバチルス・アシドテリストリス菌に対する抗菌作用については報告されていない。また、このチオニンは、前記の乳酸菌由来ナイシンと異なり、特殊なアミノ酸を一切含んでいない。

【0004】 本発明の目的は、耐酸性と耐熱性を有し、果汁の腐敗を引き起すアリシクロバチルス・アシドテリストリス菌の増殖を阻害する作用を有し、かつ天然物に由来する安全性の高い抗菌剤を提供することである。さらには、係る物質よりなる果汁の保存料を提供することである。

とである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、上記の課題を解決すべく、種々の農作物からアリシクロバチルス・アシドテリストリス菌用の抗菌性物質を検索した結果、麦類ペプチドであるアルファ型およびベータ型チオニンが、本菌の増殖を阻害する作用を有していることを見出し、かかる知見に基づいて本発明を完成した。

【0006】 すなわち本発明は、アルファ型および／またはベータ型チオニンを有効成分として含有することを特徴とする耐酸耐熱性細菌用抗菌剤に関する。さらに本発明は、アルファ型および／またはベータ型チオニンを有効成分として含有することを特徴とする果汁の保存料に関する。

## 【0007】

【発明の実施の形態】 本発明に用いるチオニンは、大麦、小麦、燕麦、ライ麦等の麦類の穀粒粉から食塩水や塩酸、硫酸、酢酸などの酸によって抽出することができる他、チオニン遺伝子を含む組換え微生物や植物を用いて生産することもできる。アルファ型およびベータ型チオニンは、いずれも約45個のアミノ酸で構成され、そのうちシスティンが約8個含まれており、しかもそれらのシスティンの一部または全てがジスルフィド結合により内部架橋している構造を特徴とする。また、果汁のpHは通常3～4の範囲であるが、これらのチオニンは酸性中でも変性しない。

【0008】 麦抽出液を硫安塩析等により濃縮し、さらに高速液体クロマトグラフィーを用いることによって、チオニンを精製することができるが、精製途中の混合物(粗精製物) であっても抗菌作用を有しているものは、本発明に使用することができる。大麦からのチオニンの抽出・精製法の一例は、Planta, 176巻、221～229頁(1988年)に記載されており、他の麦類から抽出・精製する場合も、この方法に準じて行うことが可能である。

【0009】 大麦、小麦、燕麦のチオニンの全アミノ酸配列 (Plant Molecular Biology, 26巻、25～37頁、1994年) やライ麦チオニンのアミノ酸組成 (Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26巻、794～796頁、1978年) は、既に知られている。なお、麦の品種によっては、公知のアミノ酸組成や配列と比べて、1個もしくは数個のアミノ酸残基が置換したり、付加もしくは欠失するペプチドが存在するが、目的とする抗菌作用を有しているかぎり、これらも本発明に用いるチオニンに包含される。

【0010】 チオニンを耐酸耐熱性細菌用抗菌剤もしくは果汁の保存料として用いる場合、果汁中のアリシクロバチルス・アシドテリストリスなどの耐酸耐熱性細菌の増殖を阻害するには、チオニンあるいは粗チオニンを、精製品としてアルファ型の場合は5～100μg/m

L、ベータ型の場合は $10\sim100\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度の濃度となるように果汁に添加すればよい。また、チオニンを酸性条件下、 $100^\circ\text{C}$ で10分間加熱しても、抗菌活性は失われない (Agric. Biol. Chem., 34巻、1089~1094頁、1970年) ため、チオニンを果汁に添加してから低温殺菌を行っても、チオニンの抗菌効果は維持される。チオニンに対する耐性変異菌は未だ報告されておらず、またチオニンはトリプシン等の消化酵素で速やかに分解される (日本食品科学工学会誌、47巻、423~429頁2000年) ことから、腸内細菌への影響は極めて小さいと考えられる。さらに、モルモットに $103\sim229\text{mg}/\text{kg}$ 体重のチオニンを1回経口投与し、投与後7日間観察したが、異常は認められなかったと報告されている (Cereal Chem., 19巻、301~307頁、1942年)。

## 【0011】

【実施例】以下に、実施例をあげて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

## 【0012】製造例1

大麦の1種である裸麦の「イチバンボシ」穀粒をサイクロンミルで粉末状にしたもの $100\text{g}$ に蒸留水 $300\text{mL}$ を加え、 $4^\circ\text{C}$ で1時間攪拌後、遠心分離し、上清を除いた。次に、沈殿物に $200\text{mL}$ の1M食塩水を加え、 $4^\circ\text{C}$ で2時間攪拌したのち、遠心分離を行った。得られた上清を硫安 ( $50\sim90\%$ 飽和) 塩析し、回収した沈殿物をリン酸緩衝液を用いて懸濁した。その遠心上清を製造例1と同じ条件で高速液体クロマトグラフィーに供することにより、精製大麦アルファ型およびベータ型チオニンを得た。カラムは、Wakosil 5C4-200、 $4.6\text{mm}\phi\times250\text{mm}$  (和光純薬) を用い、 $0.1\%$ トリフルオロ酢酸と $0\rightarrow40\%$  ( $0\rightarrow40$ 分) アセトニトリルを含む水 ( $\text{pH }2.1$ ) による濃度勾配溶出を流速 $0.5\text{mL}/\text{分}$ で行い、集めた画分は遠心濃縮器で乾固させ、アミノ酸分析およびマススペクトル分析により、アルファ型チオニンであることを確認した。薄力小麦粉 $1\text{kg}$ あたりに換算して、 $40\text{mg}$ のアルファ型チオニンを得た。

トル分析により、アルファ型およびベータ型チオニンで

あることを確認した。「イチバンボシ」穀粒粉末 $1\text{kg}$ あたりに換算して、 $37\text{mg}$ のアルファ型チオニンおよび $12\text{mg}$ のベータ型チオニンをそれぞれ得た。

## 【0013】製造例2

市販薄力小麦粉 $100\text{g}$ に $0.15\text{N}$ 塩酸 $300\text{mL}$ を加えて攪拌後、 $37^\circ\text{C}$ で30分間静置し、再び攪拌した後に遠心分離し、得られた上清に $10\text{N}$ 水酸化ナトリウム水溶液を滴下して中和した。これを、再度遠心分離した。このようにして得た上清を硫安 ( $50\sim90\%$ 飽和) 塩析し、回収した沈殿物をリン酸緩衝液を用いて懸濁した。その遠心上清を製造例1と同じ条件で高速液体クロマトグラフィーに供することにより、精製小麦アルファ型チオニンを得た。集めた画分は遠心濃縮器で乾固させ、アミノ酸分析およびマススペクトル分析により、アルファ型チオニンであることを確認した。薄力小麦粉 $1\text{kg}$ あたりに換算して、 $40\text{mg}$ のアルファ型チオニンを得た。

## 【0014】実施例1

アリシクロバチルス・アシドテレストリス ATCC 49025株をYPG B培地 (酵母エキス $0.25\%$ 、ポリペプトン $0.5\%$ 、D-グルコース $0.1\%$ 、硫酸マグネシウム7水和物 $0.05\%$ 、塩化カリウム $0.2\%$ 、 $\text{pH }4$ ) に接種して $37^\circ\text{C}$ で2日間培養したのち、 $60^\circ\text{C}$ で1時間処理して胞子懸濁液を調製した。製造例1および2で得た各種チオニンの所定量を含むYPG B培地に胞子懸濁液を $1\times10^4$  個/ $\text{mL}$ になるように接種し、さらに $37^\circ\text{C}$ で2日間培養して菌の増殖を調べた。得られた結果を第1表に示した。なお、菌の増殖の有無は、培地の濁度を目視で判定した。なお、チオニンの添加量が $50\mu\text{g}/\text{mL}$ および $100\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合、培地に濁りが生じたため、希釈平板培養により菌の増殖の有無を判定した。また、対照のチオニン無添加の場合には、いずれの試験区も菌の増殖が認められた。

## 【0015】

【表1】第1表

チオニンの種類	増殖の有無						
	チオニン濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )						
	100	50	20	10	5	2	1
大麦アルファ型	—	—	—	—	—	+	+
小麦アルファ型	—	—	—	—	—	+	+
大麦ベータ型	—	—	—	—	+	+	+

## 【0016】実施例2

市販の果汁 $100\%$ 濃縮還元オレンジジュースおよびリンゴジュース ( $\text{pH}$ はいずれも $3.6$ ) に、大麦アルファ型チオニンを $20\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加し、さらに実施例1で調製したアリシクロバチルス・アシドテレストリス ATCC 49025株の胞子懸濁液を $1\times10^6$  個/ $\text{mL}$ となるように接種し、 $37^\circ\text{C}$ で保温し

た。ポテトデキストロース寒天培地 (日水製薬) を用いた希釈平板培養 ( $37^\circ\text{C}$ 、2日間) により、ジュース中の残存生菌数を経時的に計測したところ、図1に示した結果が得られた。図中、Aはオレンジジュース、Bはリンゴジュースの結果を示す。図から明らかのように、アリシクロバチルス・アシドテレストリスの生菌数は経時に減少し、大麦アルファ型チオニンの添加による効果

が確認された。

【0017】

【発明の効果】本発明により、天然物に由来し、安全性の高いチオニンを有効成分とする抗菌剤が提供される。さらに、チオニンを有効成分として含有する果汁の保存料も提供される。この抗菌剤等は、果汁の腐敗を引き起こすアリシクロバチルス・アシドテレストリスなどの耐酸耐熱性細菌の増殖を阻害する作用を有している。しか

も、チオニンは酸性条件で加熱しても変性しないので、果汁の腐敗防止に有効である。チオニンの水溶液は、透明、無臭であり、果汁の風味に影響しない。

【図面の簡単な説明】

【図1】チオニンを添加したジュース中におけるアリシクロバチルス・アシドテレストリスの残存生菌数を経時的に示したものである。Aはオレンジジュース、Bはリンゴジュースの結果を示す。

【図1】

